

И.А.Федоров

## ХАРАКТЕРИСТИКА ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА В БРОНХИАЛЬНОМ ДЕРЕВЕ У ДЕТЕЙ ПРИ ТЯЖЕЛЫХ ФОРМАХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ В ФАЗУ РЕМИССИИ

Челябинская медицинская академия и городская клиническая больница № 1

### CHARACTERIZATION OF INFLAMMATORY PROCESS IN BRONCHIAL TREE IN SEVERE BRONCHIAL ASTHMA CHILDREN IN REMISSION

I.A.Fedorov

#### Summary

Bronchological study was performed in 123 children with severe and moderate bronchial asthma at their remission stages. Severe asthma course was in 83 children. The patients' age was 4—14 years. Broncho-alveolar lavage fluid and bronchial biopsies were investigated (84 and 37 samples correspondingly). The complex examination carried out has shown that severe inflammation signs remain in bronchial mucous membrane in severe asthma remissions due to IgE-depended and immunocomplex mechanisms, reduction of antibody-producing cells number, hyperplasia and degranulation of APUD-cells and imbalance of cyclic nucleotides.

#### Резюме

Бронхологическое обследование было выполнено в фазу ремиссии у 123 детей с тяжелым и среднетяжелым течением бронхиальной астмы. Из них у 83 детей отмечалось тяжелое течение бронхиальной астмы. Возраст пациентов составил 4—14 лет. Материалом для исследования послужили бронхоальвеолярная жидкость и бронхобиоптаты (84 и 37 соответственно). Проведенное комплексное исследование показало, что при тяжелом течении бронхиальной астмы у детей в фазе ремиссии сохраняются выраженные признаки воспаления в слизистой оболочке бронхиального дерева, опосредованные IgE-зависимыми и иммунокомплексными механизмами, снижением антителообразующих клеток, гиперплазией и дегрануляцией APUD-клеток и дисбалансом циклических нуклеотидов.

Ведущим механизмом патогенеза бронхиальной астмы (БА) является аллергическое воспаление [1,3]. Комплексное бронхологическое и иммуноморфологическое исследование позволяет наиболее объективно оценить состояние слизистой оболочки бронхов, выраженность воспалительных процессов и их роль в патогенезе и тяжести течения БА непосредственно на уровне шовного органа.

Целью настоящей работы явилась оценка характера воспалительного процесса в слизистой бронхиального дерева у детей при тяжелом течении БА в фазу ремиссии.

Бронхологическое обследование проведено у 123 детей с тяжелым и среднетяжелым течением БА в фазу ремиссии. Из них у 83 детей отмечалось тяжелое течение БА. При постановке клинического диагноза использовались критерии [7]. Возраст пациентов был от 4 до 14 лет. Материалом для исследования послужили бронхоальвеолярная жидкость (БАЛЖ) и биоптаты слизистой из области шпоры среднедолевого бронха (84 из 37 соответственно). Для цитологического и цитохимического контроля БАЛЖ использована эндобронхальная цитогарма двух здоровых детей, у

которых бронхоскопия проводилась в связи с подозрением на аспирацию инородного тела. Все исследования осуществлялись с одобрения этического комитета и согласия родителей. Непосредственно перед лечебно-диагностической бронхоскопией детям проводилась контрольная пикфлоуметрия. При оценке эндоскопической картины была использована классификация эндобронхитов у детей (Климанская Е.В., 1972) и критерии J.M.Lemoine (1971). Общий подсчет клеток БАЛЖ проводился в камере Горяева; клеточный состав БАЛЖ оценивался после центрифугирования и окраски мазков по Романовскому-Гимзе; оценка нагруженности липидами макрофагов при окраске их суданом черным проводилась по методике Sheehan et Storey (1957), при этом подсчитывалось общее число липофагов-макрофагов, содержащих липиды на 100 макрофагов и средний цитохимический коэффициент. Содержание иммуноглобулинов в БАЛЖ определяли методом радиальной иммунодиффузии [13], уровень компонентов комплемента методом молекулярного титрования [14], количество фактора некроза опухоли альфа (TNF- $\alpha$ ) с помощью ИФА тестсистемы фирмы "INNOGENETICS" (Бельгия), уровень интерлейкина-4 (IL-4) с помощью



Таблица 1

**Морфометрическая характеристика слизистой оболочки среднедолевых бронхов у детей при БА в фазу ремиссии в зависимости от тяжести течения ( $M \pm m$ )**

Исследуемый показатель	Среднетяжелая БА (n=10)	Тяжелая (n=27)
Ширина эпителиального пласта, мкм	38,2±0,5	36,3±1,2
Ширина базальной пластинки, мкм	5,3±0,1*	5,7±0,1
Капилляры, %	13,3±0,2*	12,4±0,2
Эозинофилы, %	13,5±0,2*	17,1±0,2
Мышечные пучки, %	7,5±0,1*	6,2±0,1
Соединительная ткань, %	24,1±0,2*	34,4±0,3
Аргирофильные апудоциты	32,1±0,6*	34,6±0,4
Серотонинсодержащие апудоциты	15,2±1,3*	21,1±1,2
Адреналинсодержащие апудоциты	14,1±0,5*	17,6±0,6
Клетки, содержащие IgE	25,5±1,2*	37,6±2,4
Антителообразующие клетки		
IgA	5,4±0,2*	2,4±0,3
IgM	5,1±0,4*	2,2±0,5
IgG	17,1±0,4*	10,8±0,3
Гладкомышечные клетки, содержащие		
цАМФ	6,6±0,1*	6,4±0,03
цГМФ	15,3±1,5*	21,6±1,1
Соотношение цАМФ/цГМФ	0,5±0,01*	0,25±0,01
ФИК, содержащие в %		
IgA	30	29,6
IgM	30	40,7
IgG	50	59,2
С3-фракцию комплемента	30*	92,5

Примечание. \* — достоверность различий между группами ( $p < 0,05$ ).

ИФА тест-системы фирмы "ISD" (Англия), активность лизоцима нефелометрическим методом [4]. Биоптаты слизистой оболочки бронхов изучали путем приготовления парафиновых срезов и их окраски гематоксилином и эозином; по Ван Гизону — для выявления коллагеновых волокон; по Гримелиусу — для верификации аргирофильных APUD-клеток. С помощью прямого метода Кунса определяли IgA, IgE, IgG, IgM и фиксированные иммунные комплексы. Определение биогенных аминов — серотонина, адреналина и цик-

лических нуклеотидов — цАМФ, цГМФ проводилось непрямым методом Кунса в парафиновых срезах с соответствующими контрольными реакциями. Для иммуногистохимических исследований использовались реагенты производства Всероссийского научного центра по безопасности биологически активных веществ и фирмы "Sigma" (США); морфометрические исследования — путем подсчета числа клеточных элементов в стенке бронха в 5 полях зрения при ув.  $\times 400$ , а также методом "точечного счета" с помощью окулярной стереометрической сетки.

При тяжелой форме БА в фазу ремиссии достоверно чаще выявлялся диффузный катаральный эндобронхит (65% случаев), также как и суммарно различные варианты эндобронхита (82%) отмечались чаще у детей с тяжелой БА в сравнении с детьми со среднетяжелой БА. Сочетание эндобронхита с гипертрофией слизистой отмечено только у трех детей при тяжелой БА.

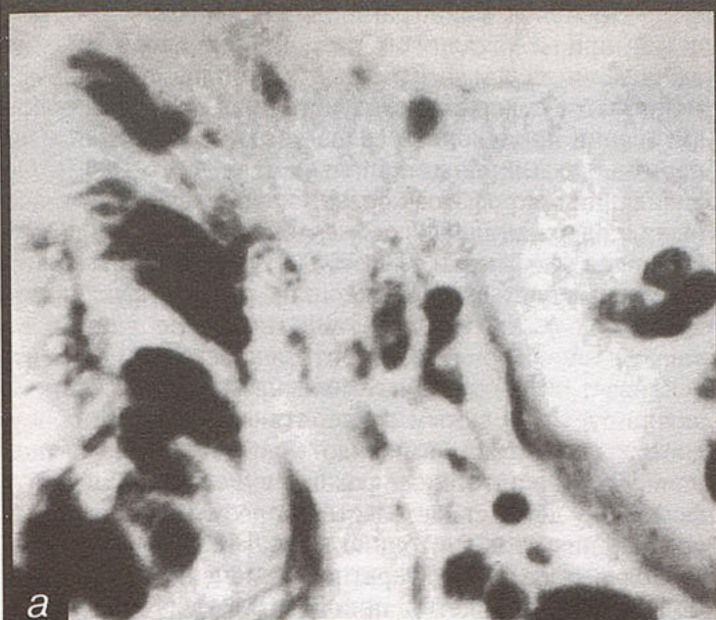
Морфологическое исследование бронхобиоптатов у детей, страдающих БА различной степени тяжести, в фазу клинко-функциональной ремиссии выявило сложный комплекс структурных изменений, включающих альтеративные, сосудисто-экссудативные, склеротические и компенсаторно-приспособительные процессы. У 27 детей с тяжелыми формами был обнаружен вторичный катарально-склерозирующий хронический бронхит с явлениями очагового и реже диффузного склероза (у 10 человек), в группе со среднетяжелым течением БА (10 детей) определялся вторичный катаральный хронический бронхит. При тяжелой форме БА по сравнению со среднетяжелым ее течением (табл.1) выявлена тенденция к уменьшению ширины эпителиального пласта и существенное снижение объемной плотности капилляров и мышечных пучков в собственной пластинке слизистой оболочки бронхов. В то же время ширина базальной пластинки, объемная плотность эозинофилов и соединительной ткани при тяжелом течении БА значительно увеличивались. Группа детей с тяжелой формой БА характеризовалась наибольшим количеством клеток, содержащих и несущих IgE, APUD-клеток, содержащих биогенные амины, на фоне уменьшения количества иммуноглобулинпродуцирующих клеток и гладкомышечных клеток, содержащих цАМФ (рис.1). В этой связи соотношение цАМФ/цГМФ у детей при тяжелой БА было существенно ниже, чем в группе сравнения. Фиксированные иммунные комплексы, содержащие С3-фракцию комплемента, также достоверно чаще регистрировались у пациентов с тяжелой формой БА.

Общее количество клеток БАЛЖ (в мл  $\times 10^6$ ) у детей при тяжелом течении БА было существенно

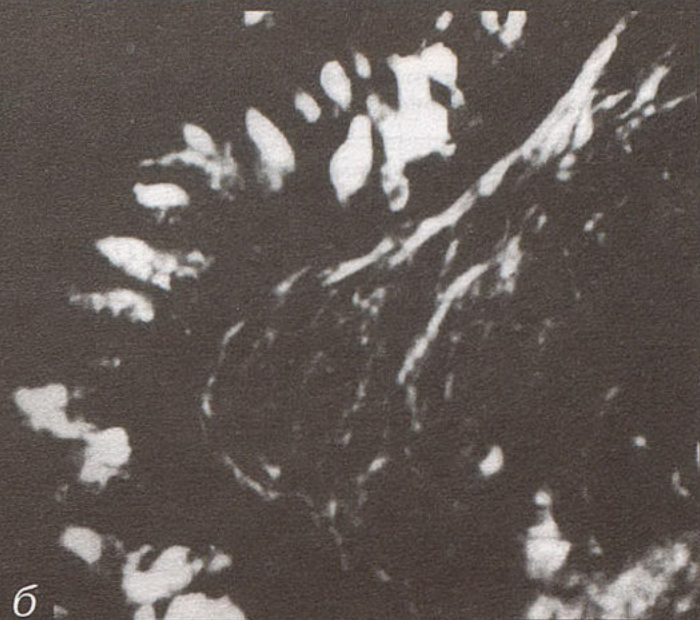
Рис.1. Морфофункциональная характеристика слизистой бронхов при бронхиальной астме у детей в фазу ремиссии.

а — APUD-клетки, содержащие аргирофильную зернистость в слизистой оболочке бронха  $\times 200$ ; б — апудоциты, содержащие серотонин, в слизистой оболочке и подслизистом слое бронха  $\times 630$ ; в — иммуноглобулин Е, фиксированный на поверхности эпителиоцитов слизистой оболочки, базальной мемbrane и клеточных элементах подслизистого слоя бронха  $\times 630$ ; г — гладкомышечные клетки бронха, содержащие цГМФ  $\times 400$ ; д — фиксированные иммунные комплексы, содержащие С3-компонент комплемента, в стенке кровеносного сосуда и периваскулярной ткани.  $\times 900$ ; е — антителообразующие клетки, содержащие иммуноглобулин G, в подслизистом слое бронха  $\times 630$ . Окраска: а — посеребрение по Гримелиусу; б–е — реакция иммунофлюоресценции.





a



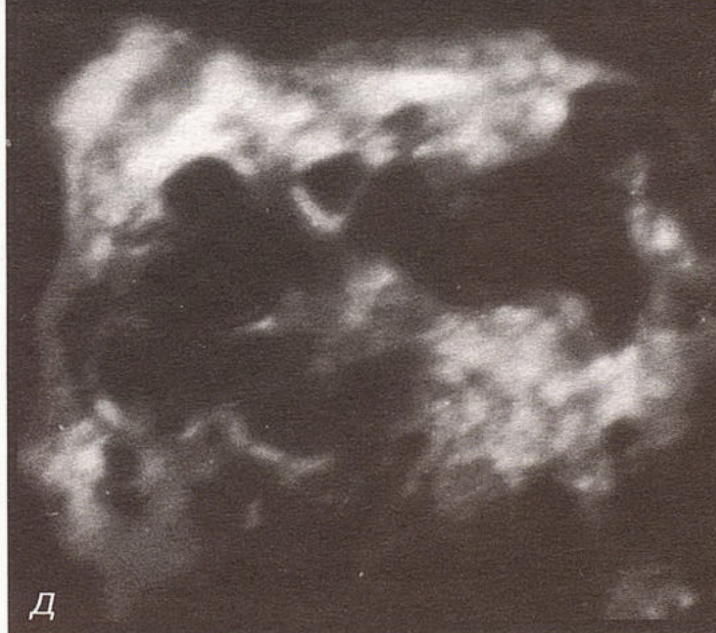
б



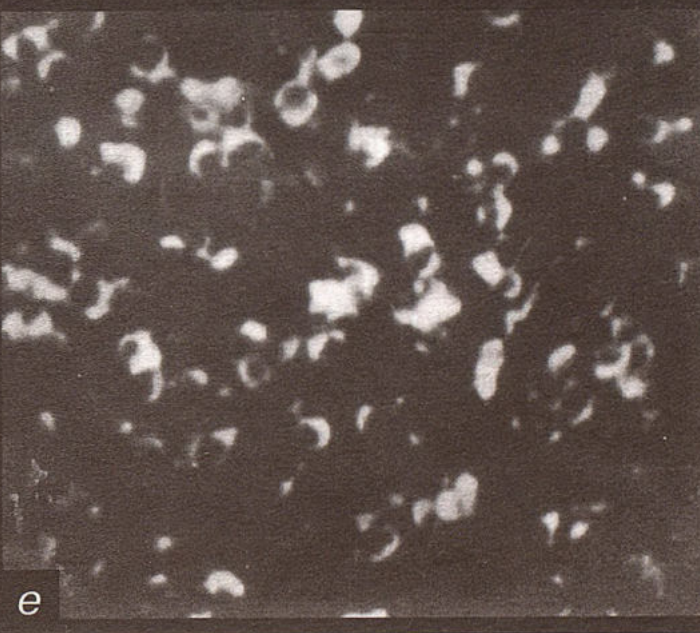
в



г



д



e



Таблица 2

Показатели иммунитета и медиаторов воспаления БАЛЖ у детей при БА в зависимости от тяжести течения ( $M \pm m$ )

Показатели	n	Тяжелая БА	n	Среднетяжелая БА
TNF- $\alpha$ , пг/мл	28	217,5 $\pm$ 31,8*	16	117,8 $\pm$ 22,2
IL-4, пг/мл	21	92,6 $\pm$ 17,2*	14	43,0 $\pm$ 9,1
C <sub>1</sub> $\times 10^8$ ед. эф.мол.	50	15,7 $\pm$ 0,8*	29	18,0 $\pm$ 0,6
C <sub>3</sub> $\times 10^8$ ед. эф.мол.	50	16,7 $\pm$ 0,8	31	16,7 $\pm$ 0,8
C <sub>5</sub> $\times 10^8$ ед. эф.мол.	53	18,6 $\pm$ 0,6	29	19,1 $\pm$ 0,8
SIgA, г/л	21	0,3 $\pm$ 0,03	14	0,34 $\pm$ 0,4
IgM, г/л	30	0,2 $\pm$ 0,002*	14	0,3 $\pm$ 0,05
Лизоцим, мкг/мл	53	4,3 $\pm$ 0,2*	29	3,7 $\pm$ 0,2

Примечание. \* — достоверность различий между группами ( $p < 0,05$ ).

ниже, чем при среднетяжелом течении БА. Эндопульмональная цитограмма у детей при БА была представлена альвеолярными макрофагами, эозинофилами, нейтрофилами, лимфоцитами, моноцитами и клетками реснитчатого эпителия. У детей при БА тяжелого течения в БАЛЖ получено существенное увеличение относительного числа эозинофилов, нейтрофилов, макрофагов и среднего цитохимического коэффициента на фоне снижения числа макрофагов и лимфоцитов по сравнению с группой здоровых детей. Снижение относительного числа лимфоцитов и макрофагов служит косвенным признаком так называемого численного "лимфоцитарно-макрофагального дефицита", что может рассматриваться как маркер нарушения местной антимикробной защиты бронхов [8].

Как видно из табл.2, тяжелое течение БА в фазу ремиссии, в отличие от ее среднетяжелого варианта, характеризовалось увеличением уровня TNF- $\alpha$ , активности лизоцима, двукратного увеличения IL-4 на фоне снижения активности компонента комплемента C<sub>1</sub> и содержания IgM в БАЛЖ ( $p < 0,05$ ). Существенной разницы в отношении количества компонентов комплемента (C<sub>3</sub> и C<sub>5</sub>) и SIgA нами не было выявлено.

Снижение общего количества клеток БАЛЖ (в мл  $\times 10^6$ ) у детей при тяжелом течении БА может быть связано с более выраженной экспрессией (на фоне выраженного воспаления) адгезивных молекул на эпителиальных и эндотелиальных клетках, препятствующих попаданию клеток в просвет бронхиального дерева, а также в результате субэпителиального фиброза и эпителиальной метаплазии [10]. Достоверных различий эндопульмональных цитограмм у детей с БА в зависимости от степени тяжести заболевания не было получено, что подтверждает принципиальную роль воспаления в патогенезе развития БА в независимости от степени тяжести заболевания. Цитологическое и цитохимическое исследование выявило существенное увеличение относительного числа эозинофилов, нейтрофилов, макрофагов и степени их нагруженности липидами на

фоне снижения макрофагов и лимфоцитов в БАЛЖ у детей при БА тяжелой степени по сравнению со здоровыми детьми. В норме цитоплазма тканевых макрофагов содержит мало липидных включений. При активации происходит резкое увеличение количества и размеров липидных капель в этих клетках [2]. Об активации макрофагов косвенно свидетельствуют данные о содержании TNF- $\alpha$  и лизоцима, которые продуцируются этим типом клеток. TNF- $\alpha$  является медиатором воспаления и обладает многочисленными функциями, в том числе при воздействии на Fas-рецепторы он способствует процессам апоптоза клеток, несущих их, усиливает экспрессию адгезивных молекул на клетках, активирует тем самым воздействие лейкоцитов сосудистого русла с клетками эндотелия [5,11]. О вероятной роли TNF- $\alpha$  в патогенезе развития и течения тяжелых форм БА у детей свидетельствуют результаты изучения содержания этого цитокина в БАЛЖ.

Полученное нами двукратное увеличение содержания IL-4 в БАЛЖ у детей при БА тяжелого течения в период ремиссии по сравнению со среднетяжелым течением может свидетельствовать об усилении функции Т-хелперов 2 и более напряженном IgE-зависимом ответе в этих условиях. Несмотря на то, что бронхологические исследования проводились в период ремиссии, увеличение уровня IL-4 при тяжелой БА может отражать постоянно активирующую роль причинно значимых аллергенов на клетки-продуценты цитокинов или непрерывное течение аллергического воспаления с чередованием периодов затихания и обострения [3,7]. На нашем материале об IgE-зависимом механизме, лежащем в основе воспаления при БА тяжелой степени, свидетельствуют следующие морфологические изменения в слизистой стенки бронха: увеличение количества клеток, содержащих IgE, сосудисто-экссудативные реакции с тканевой эозинофилией, гиперплазия и дегрануляция APUD-клеток со значительным преобладанием серотонинпродуцирующих апудоцитов в сравнении со среднетяжелым течением БА.

Выявленное уменьшение числа эффективных молекул C<sub>1</sub> в БАЛЖ при тяжелом течении БА может отражать активацию системы комплемента по классическому пути и локальное его потребление фиксированными иммунными комплексами и потому более выраженное повреждение слизистой бронхиального дерева с участием этой системы в сравнении со среднетяжелым течением БА.

Иммунокомплексный тип реакций у детей при БА тяжелой степени подтверждался более частой регистрацией фиксированных иммунных комплексов (ИК), содержащих C<sub>3</sub>-компонент комплемента, в стенках бронхиальных сосудов и периваскулярной ткани в сравнении с БА среднетяжелого течения. Вероятно, длительное персистирование в бронхах иммунных комплексов вызывает фибропластическую реакцию и развитие в них склероза. При этом развитие склероза может иметь в какой-то степени и приспособительный характер как временное восстановление целостности эпителиального барьера. Однако альтерация эпителия продолжается в связи с течением воспаления, опосре-



дованного иммунными комплексами и присоединением тромбоза микроциркуляторного русла, что вызывает вновь альтерацию эпителия и поэтому иммунокомплексные реакции могут расцениваться как фактор хронизации воспалительного процесса [6].

Гиперплазия апудоцитов бронхов приводит к гиперпродукции биогенных аминов, оказывает прямое (короткодистантное) воздействие на гладкую мускулатуру бронхиальной стенки и сосудов, повышает проницаемость эндотелиального и эпителиального барьера, стимулирует синтетическую активность glanduloцитов желез. Это позволяет трактовать участие апудоцитов бронхов и секретируемых ими биогенных аминов в качестве факторов, поддерживающих воспалительный процесс, способствующих его хронизации и влияющих на регуляцию тонуса и проходимости бронхиального дерева при БА в фазу ремиссии [1,8]. Дисбаланс циклических нуклеотидов отражает возможную десенситизацию  $\beta$ -адренорецепторов на фоне применения адреномиметиков и воздействия катехоламинов, освобождающихся в результате дегрануляции адреналин-содержащих апудоцитов. Выявленное низкое содержание антителообразующих клеток с иммуноглобулинами разных классов (IgA, IgG, IgM), особенно выраженное у детей с тяжелым течением БА, может свидетельствовать о снижении противомикробной защиты слизистых бронхов [9]. Уменьшение количества IgM-продуцирующих клеток может быть также связано с эффектом IL-4, который переключает IgM-несущие предшественники В-клеток на IgG и IgE-несущие [3,12]. В развитии иммунодефицита при БА могут принимать участие биогенные амины, которые ингибируют пролиферацию иммунокомпетентных клеток. Дефицит IgM в БАЛЖ может быть следствием и бактериальной колонизации, а также частичным потреблением иммуноглобулинов фиксированными иммунными комплексами.

Таким образом, проведенное комплексное исследование показало, что при тяжелом течении БА у детей в фазе ремиссии сохраняются выраженные признаки воспаления в слизистой бронхиального дерева, опосредованные IgE и ИК-зависимыми механизмами, снижением числа антителообразующих клеток, гиперплазией и дегрануляцией APUD-клеток и дисбалансом циклических нуклеотидов.

### Выводы

1. Тяжесть течения бронхиальной астмы у детей зависит от выраженности аллергического воспаления и склеротических изменений в слизистой оболочке бронхов. Тяжелое течение бронхиальной астмы в отличие от ее среднетяжелого варианта в стадии ремиссии характеризуется большей частотой регистрации IgE-продуцирующих клеток, эозинофильных гранулоцитов, аминокислотсодержащих APUD-клеток, фик-

сированных иммунных комплексов с С<sub>3</sub>-фракцией комплемента, снижением числа антителопродуцирующих клеток, развитием вторичного катарально-склерозирующего хронического бронхита.

2. Тяжелая форма бронхиальной астмы у детей, в отличие от ее среднетяжелого течения, в периоде ремиссии характеризуется повышенным содержанием ключевых эндогенных медиаторов аллергического воспаления TNF- $\alpha$ , IL-4, увеличением активности лизоцима на фоне уменьшения числа эффективных молекул компонента комплемента C<sub>1</sub> в БАЛЖ.
3. Увеличение числа адреналин- и серотонинпродуцирующих APUD-клеток, а также уменьшение соотношения цАМФ/цГМФ в клетках гладкой мускулатуры являются одним из механизмов сохранения бронхиальной гиперреактивности и персистенции воспаления при тяжелых формах бронхиальной астмы в период ремиссии.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Балаболкин И.И. Бронхиальная астма // Аллергические болезни у детей: Руководство для врачей / Под ред. М.Я. Студеникина, И.И. Балаболкина. — М.: Медицина, 1998. — С.188—213.
2. Виноградов В.В., Правоторов Г.В. Липидный метаболизм макрофагов: морфофизиологический аспект // Бюл. Сиб. отд. Рос. АМН. — 1992. — № 1. — С.89—96.
3. Гуцин И.С. Аллергическое воспаление и его фармакологический контроль — М.: "Фармарус Принт", 1998. — 252 с.
4. Дорофейчук В.Г., Жукова Н.П., Спасская З.А. и др. Лизоцимная активность сыворотки крови детей в онтогенезе и клинике некоторых заболеваний // Биологическая роль лизоцима и его лечебное применение. — Караганда, 1972. — С.79—81.
5. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., Воробьев А.А. Эндогенные медиаторы иммунитета. — СПб: Гиппократ, 1992. — 256 с.
6. Кононов А.В. Местный иммунитет и регенерация слизистых оболочек при хроническом воспалении (биопсийное исследование). — Омск, 1993. — 320 с.
7. Национальная программа "Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика". — М., 1997. — 103 с.
8. Федосеев Г.Б. Бронхиальная астма. — М.: Мед. информ. агентство, 1995. — 336 с.
9. Чучалин А.Г. Бронхиальная астма. — М.: Агар, 1997. — Т. 1. — 432 с.
10. Шубич М.Г., Авдеева М.Г., Васкуленко А.Д. Адгезивные межклеточные взаимодействия // Арх. пат. — 1997. — № 6. — С.3—9.
11. Ярилин А.А. Система цитокинов и принципы ее функционирования в норме и при патологии // Иммунология. — 1997. — № 5. — С.7—13.
12. Bradding P. Human mast cell cytokines // Clin. Exp. Allergy. — 1996. — Vol.26. — P.13—19.
13. Mancini G., Carbonara A.O., Heremans J.E. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion // Immunochemistry. — 1965. — Vol.2, № 3. — P.235—254.
14. Tanaka S., Suzuki T., Nishioka K. Assay of classical and alternative pathway activities of murine complement using antibody sensitized rabbit erythrocytes // J. Immunol. Meth. — 1986. — Vol.86. — P.161—170.

Поступила 15.01.99.